

Nota Fitopatológica

Etiología de la pudrición del rizoma del espárrago (*Asparagus officinalis*) en Atenco, Estado de México

Juan Agustín González-Cruces*, José Sergio Sandoval-Islas, Cristian Nava-Díaz, Maricarmen Sandoval-Sánchez, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México.

*Autor de
correspondencia:

Juan Agustín
González-Cruces
gonzalez.agustin@colpos.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
30 Noviembre, 2022

Aceptado:
20 Octubre, 2023

Publicado:
16 Noviembre, 2023

Cita:
González-Cruces JA,
Sandoval-Islas JS,
Nava-Díaz C y Sandoval-
Sánchez M. 2024.
Etiología de la pudrición
del rizoma del espárrago
(*Asparagus officinalis*) en
Atenco, Estado de México.

Revista Mexicana de
Fitopatología 42(1): 2.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2211-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2211-1)

RESUMEN

Objetivo/antecedentes. El objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la pudrición del rizoma del espárrago, así como evaluar distintos métodos de inoculación y la severidad de los aislados.

Materiales y métodos. El muestreo se realizó en cinco parcelas productoras Atenco, Edo. de México. Se seleccionaron cinco aislados de *Fusarium* spp. (una por parcela) para realizar las pruebas de patogenicidad. Se seleccionaron tres aislados por sus características de colonización para las pruebas de severidad con diferentes métodos de inoculación: Inmersión por 12 h, inmersión por 30 min e inoculación por contacto de papel absorbente embebido en 1 mL de inóculo. Se emplearon concentraciones de 1×10^6 de conidios mL^{-1} . Se utilizaron 10 rizomas por tratamiento y 10 rizomas sin inocular. Para determinar la severidad, se analizaron fotografías (en GIMP[®]) del rizoma a los siete días después de la inoculación. Los aislados se identificaron molecularmente con ITS4/ITS5, EF688/EF1521 y TUBT1/BT2B.

Resultados. Se identificó morfológica y molecularmente a *Fusarium proliferatum* en los tres aislados. El aislado P3DR fue el más severo (14.6%), seguido de P5DR (13.9%) y P1SIR (11.6%).

Conclusión. El método de inoculación más efectivo fue el de inmersión por 30 min. Se registraron en el Banco de Genes del NCBI con accesiones ON738484 (P3DR), ON973801 (P5DR) y ON738483 (P1SIR). Este es el primer reporte de *F. proliferatum* en el Edo. de México.

Palabras clave: *Fusarium proliferatum*, espárrago, severidad, inoculación.



INTRODUCCIÓN

El espárrago (*Asparagus officinalis*) es una hortaliza que tiene su centro de origen desde Europa Del Este, Cáucaso y Siberia (Faostat, 2019). Sin embargo, en México, es una hortaliza captadora de divisas, ya que casi el 90 % de la producción se exporta a Estados Unidos de Norteamérica y Europa. El valor económico de la producción nacional en el 2018 ascendió a 7,723 millones de pesos, al producirse 206,225 t (SIAP, 2020). Sonora (129,808 t), Guanajuato (27,146 t), Baja California (27,070 t), Baja California Sur (16,917 t) y Querétaro (5,284 t) son los principales productores de esta hortaliza y concentran el 99% de la oferta de exportación nacional (SIAP, 2022).

El espárrago es una planta perenne, diploide monocotiledónea, cuya parte comercial son los turiones que se desarrollan de yemas situadas en la parte apical del rizoma (Moreno-Pinel *et al.*, 2021). Una vez que los turiones alcanzan una longitud comercial se cortan con una cuchilla, haciendo una incisión entre la base del turión y el rizoma generando heridas en la planta con vulnerabilidad de entrada de patógenos (Moreno-Pinel *et al.*, 2021). Dentro del género *Asparagus* sólo esta especie es de importancia económica (Faostat, 2019).

A pesar de su importancia, el cultivo es afectado en todas sus etapas fenológicas por la pudrición del rizoma causado por especies del género *Fusarium*. La incidencia de este patógeno se refleja en el desarrollo de turiones (Quilambaqui *et al.*, 2004). *Fusarium proliferatum* es la especie de mayor importancia que se ha reportado como patógeno de presencia mundial y su importancia radica en la severidad con la que ataca el rizoma de genotipos susceptibles (Elmer, 1996; Moreno-Pinel *et al.*, 2021). Adicionalmente, *Fusarium* spp. se ha reportado como productor de toxinas presentes en turiones comercializables de espárrago. La presencia de estas toxinas de tipo Fumonisinas B1, B2 y B3 suponen un riesgo para la salud humana presente en turiones producidos en plantas enfermas (Seefelder *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007).

En el núcleo ejidal del municipio de Atenco, Edo. de México, el cultivo de espárrago ha tomado gran auge debido a su rentabilidad y adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona. Actualmente, el cultivo se distribuye en 20 hectáreas, todas ellas con diferentes edades de plantación, niveles tecnológicos y manejo; sin embargo, en todas las zonas productoras se han presentado problemas de pudrición del rizoma derivando en pérdidas económicas directas a los productores. Atenco es una región con posibilidad de expandir el cultivo de espárrago y debido al incremento de la incidencia de esta enfermedad, se planteó el presente trabajo con el objetivo de identificar el agente causal de la pudrición del rizoma del espárrago, evaluar la patogenicidad con distintos métodos de inoculación y evaluar la severidad de los aislados obtenidos.

Colecta de tejido vegetal. Se realizó un muestreo dirigido a cinco plantas por parcela (cinco parcelas) que presentaban síntomas de declinamiento, marchitez y amarillamiento en etapa fenológica de floración-fructificación ubicadas en el municipio de Atenco, Edo. de México. La colecta se realizó con una pala desinfestada con alcohol al 70%, desenterrando parcialmente el rizoma y cortando de 5 a 10 cm de diámetro aproximadamente. Todos los sitios de muestreo tuvieron las mismas variables genotípicas y tecnificación baja. Se utilizó un navegador GPS portátil de la marca Garmin en Reach Explorer®, para georreferenciar cada punto de muestreo. Las muestras fueron etiquetadas, registradas con un I.D. (Cuadro 1), empacadas en bolsas de polipapel y transportadas en hielera para su procesamiento en un laboratorio de Fitosanidad - Fitopatología, del Colegio de Postgraduados *Campus Montecillo*, Edo. de México.

Cuadro 1. Parcelas de esparrago muestreadas con síntomas de declinamiento y marchitez con tecnología baja (riego por gravedad y sin acolchado), manejo agronómico no orgánico y etapa fenológica floración-fructificación, en Atenco, Edo. de México.

I.D.	Predio	Coordenadas	Edad (años)	Genotipo
P1SIR	San Indalecio	19° 33" 24' N 98° 55" 54' W	3	Sulken
P2DR	Diamante	19° 33" 01' N 98° 56" 14' W	5	Sulken
P3DR	Diamante	19° 33" 02' N 98° 56" 15' W	6	Sulken
P4DR	Diamante	19° 33" 03' N 98° 56" 15' W	6	Sulken
P5DR	Diamante	19° 33" 10' N 98° 56" 10' W	6	Sulken

Aislamiento y purificación. Los tejidos de rizoma se lavaron con agua desmineralizada estéril para eliminar exceso de suelo. Cada muestra de rizoma se cortó en trozos de 1 × 1 cm con un bisturí previamente desinfestado con la ayuda de un microscopio de la marca Iroscope® YZ-6. Posteriormente el tejido se desinfestó con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min; se lavó con agua desmineralizada estéril tres veces y se transfirió a cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) Difco Laboratories®. Por cada planta (cinco plantas por parcela), se sembraron seis trozos de rizoma por caja. Las cajas Petri se incubaron durante dos días a 28 °C en una estufa de cultivo Riessa® Serie-33. Cuando se observó crecimiento micelial se procedió a purificarlos por el método de punta de hifa a cajas Petri nuevas con medio PDA. Del crecimiento micelial por punta de hifa se procedió a obtener cultivos monospóricos. Mediante el raspado con una aguja de disección curva se transfirió el crecimiento micelial de punta de hifa a un tubo Falcon de 50 mL con agua

desmineralizada estéril, se agitó con Vortex WiseMix® y se contabilizaron los conidios con un hematocitómetro Neubauer. Posteriormente se realizaron diluciones hasta 1×10^6 conidios mL⁻¹. De la última suspensión se tomaron 100 µL, los cuales se vertieron en una caja Petri con PDA y se distribuyó con un asa Digralsky estéril, se incubó a 28 °C, hasta observar crecimiento micelial individual para obtener crecimientos monospóricos.

Identificación morfológica. La identificación morfológica se realizó con ayuda de claves taxonómicas reportadas por Leslie y Summerell (2006) y Booth (1988). Los aislados se sembraron en medio de cultivo Clavel-Agar para la producción de macroconidios. Posteriormente, se realizaron preparaciones fijas para observarlas bajo el microscopio compuesto (Velab VE-B2 de 10x y 40x) integrado al Programa Motic Images Plus v2.0. Se determinó coloración micelial, así como la morfología y morfometría conidial en 60 conidios por aislado con edad de 7 días después de siembra.

Pruebas de patogenicidad. Las inoculaciones se realizaron en plántulas de espárrago del genotipo Sulken de tres meses de edad. Se inocularon cinco aislados de *Fusarium* spp. a una concentración de 1×10^6 conidios mL⁻¹ con tres repeticiones por tratamiento. De cada aislado se tuvieron rizomas sin inocular (testigos). Se establecieron tres métodos de inoculación:

Inmersión en tubos de ensayo 1. Se sumergió la zona radical de las plántulas en tubos de ensayo con 50 mL de 1×10^6 de suspensión conidial durante 30 min. (Modificado de Farahani-Kofoet *et al.*, 2020).

Inmersión en tubos de ensayo 2. Se realizó la misma metodología previamente mencionada, pero en un volumen de 10 mL de suspensión conidial y se introdujo el rizoma durante 12 h.

Inoculación mediante papel absorbente. Círculos de 5 mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 4 se embebieron en una suspensión de conidios de 1×10^6 durante 2 min. Posteriormente, se procedió a colocar los círculos de papel filtro sobre la zona apical del rizoma sin herida.

Los rizomas se evaluaron a los 7 días después de la inoculación. Posteriormente, se observó la colonización en microscopio estereoscópico y se reaislaron solo tres aislados que por sus características de colonización se evaluaron para determinar severidad.

Evaluación de severidad. Se siguió la misma metodología de inoculación previamente mencionado, con 10 repeticiones por tratamiento y testigo. Se realizó

un registro fotográfico de la zona más afectada de cada repetición. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Canon® (Réflex EOS REBEL T7 de 20.2 mp). Un total de 120 fotografías se procesaron en GIMP® v2.10, para cuantificar área total en pixeles (At) y área dañada (Ad) para determinar severidad. El porcentaje de severidad se obtuvo con la fórmula:

$$\text{Severidad} = \frac{(Ad) (100)}{At}$$

Los datos se analizaron mediante un ANOVA en el programa SAS 9.4 para determinar el aislado más severo y el método de inoculación más efectivo de acuerdo al análisis de medias por el método de LSD de Fisher (Abramoff *et al.*, 2004).

Identificación molecular y análisis filogenético. Se realizó la extracción de ADN de tres aislados mediante la técnica de CTAB al 2% (Minas *et al.*, 2011). Se determinó la concentración y pureza de los ácidos nucleicos por espectrofotometría con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EE. UU.). La confirmación de la especie se realizó molecularmente por PCR con los iniciadores ITS 4/ITS5, EF688/EF1521 y TUB T1/BT2B (Cuadro 2) en un termociclador T-100 (BioRad) con un

Cuadro 2. Iniciadores utilizados, secuencia, región del gen amplificado, tamaño de amplicón y condiciones de PCR para identificación genómica de especies de *Fusarium*.

Iniciador	Secuencia	Región	pb	Condiciones PCR	Referencia
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATAT	Región esparcidora interna	565	^ID: 95 °C 4 min 35 cycles D: 95 °C 1min A: 58 °C 1min E: 72 °C 2min EF:72 °C 10 min	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAC	transcrita rRNA			
FE688	5'-CGGTCACTTGATCTACAA	Factor de elegancia de traducción	650	ID: 95 °C 3 min 35 cycles D: 95 °C 35 s A: 59 °C 55s E: 72 °C 1:30 min EF:72 °C 10 min	Alves <i>et al.</i> , 2008
FE1521	5'-CCTCGAACTCACCAAGTAC	1- α			
TUB T1	5' AAYATGATIACIGGGICGCI	β -tubulina	560	ID: 95 °C 5 min 35 cycles D: 95 °C 1 min A: 58 °C 1 min E: 72 °C 1:30 min EF:72 °C 5 min	O'Donnell <i>et al.</i> ,1998
BT2B	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACC	Proteína constitutiva			

[^]Desnaturalización inicial (DI), Desnaturalización (D), Alineamiento (A), Extensión (E) y Extensión final (EF).

volumen final de muestra de 15 μL integrada por: 7.86 μL de agua HPLC, 3 μL de 5X de buffer PCR, 0.6 μL de dNTP's, 0.18 μL de los iniciadores (10 μM) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), 3 μL de DNA genómico (20 ng) y 0.18 μL (2U) de GoTaq[®] ADN polimerasa (Promega, EE. UU.) (Cuadro 2). Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en un fotodocumentador (UVP, Biolimaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). Los productos de PCR se enviaron a secuenciar Macrogen[®], Corea. Las secuencias se limpiaron y editaron con el programa BIO-EDIT[®] para compararlos en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Para el análisis filogenético se realizó una clasificación con el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic) utilizando los parámetros estándares de MEGA 1. Las secuencias de *F. verticillioides* (EU364864.1) y *F. fujikuroi* (CP023090.1) se seleccionaron como especies de referencia para la construcción del árbol filogenético.

Identificación morfológica. Los síntomas observados en campo fue una marchitez y amarillamiento generalizado (Figura 1 A-B). Al realizar un corte transversal de la parte basal del tallo se observó necrosis y taponamiento de haces vasculares (Figura 1 D-F). En todas las siembras de tejido del rizoma de las cinco parcelas, se observaron crecimiento similar, por lo que se seleccionó un aislado por predio. En medio PDA, los aislados P1SIR y P5DR fueron de crecimiento radial con tonalidades blanco - amarillo en el anverso y tonalidades amarillo café en reverso. El aislado P3DR se observó micelio de tonalidad blanco con características algodonosas y crecimiento radial. A los 10 días después de la siembra en todos los aislados se visualizó la presencia de monoflálices y poliflálices, así como falsas cabezas o agregados de microconidios con base aplanada, de igual manera se observaron cadenas de microconidios y sin presencia de clamidosporas. Los macroconidios proliferaron en medio Clavel-Agar donde la morfometría fue de 26.47 μm x 4.43 μm (P1SIR), 25.97 x 4.92 μm (P3DR) y 26.21 μm x 4.76 μm de largo y ancho (P5DR). Todos los macroconidios presentaron célula apical curva y célula basal en forma de pie, con tres a cinco septos. De acuerdo con Leslie y Summerell (2006) y Booth (1988), este hongo cumple con las características de *Fusarium proliferatum*, reportándose como parásito facultativo ocasionando síntomas similares a los reportados por Seefelder *et al.* (2002) y Liu *et al.* (2007).

Identificación molecular. Los productos resultantes de la extracción de ADN obtuvieron umbrales de concentración de 186.8 - 544 ng μL^{-1} y pureza 1.38 - 2.22 nm. El alineamiento de las tres secuencias en el banco de genes (GenBank) del NCBI confirmó la identificación de *F. proliferatum* con un 99 - 100% de homo-



Figura 1. Síntomas de marchitez en cultivo de espárrago de 6 años de edad. A) Parcela de espárrago con síntomas de declinamiento generalizado; B) Planta con síntomas de marchitez generalizada; C) Planta con síntomas de marchitez inicial; D) Pudrición de rizoma causada por *Fusarium proliferatum*; E) Parte basal del tallo con síntomas de ahogamiento; F) Parte basal del tallo con taponamiento de haces vasculares.

ología. Los aislados se registraron en el GenBank con las accesiones ON738483 (P1SIR), ON738484 (P3DR) y ON973801 (P5DR). La presencia y prevalencia de *F. proliferatum* como principal patógeno en espárrago se ha reportado en los principales estados productores de esta hortaliza (Quilambaqui *et al.*, 2004; Camacho-Aguiñiga *et al.*, 2016). La incidencia de este patógeno en el rizoma, así como su prevalencia en áreas de producción en el municipio de Atenco, puede deberse a la movilización de material propagativo para el establecimiento de nuevas parcelas productoras de espárrago.

Por otra parte, la construcción del árbol filogenético permitió agrupar las tres secuencias en un grupo de acuerdo con la homología en ellas, y dejó como clado externo la secuencia de *F. verticilliodes* (EU364864.1). Esta especie estuvo distante del nodo principal de *F. proliferatum* de modo contrario que *F. fujikuroi* (CP023090.1), el cual se presentó en el mismo clado (Figura 2). La distancia y organización entre clados coincide con lo propuesto por Aoki *et al.* (2014) y Mendoza-Ramos *et al.* (2021); ya que, en el árbol filogenético que estos autores presentaron, *F. proliferatum* pertenece al complejo *F. fujikuroi*. Sin embargo, es necesario remarcar que *F. proliferatum* conforma un grupo evolutivo diverso, por lo que podrían requerirse estudios complementarios (Leslie y Summerell, 2006).

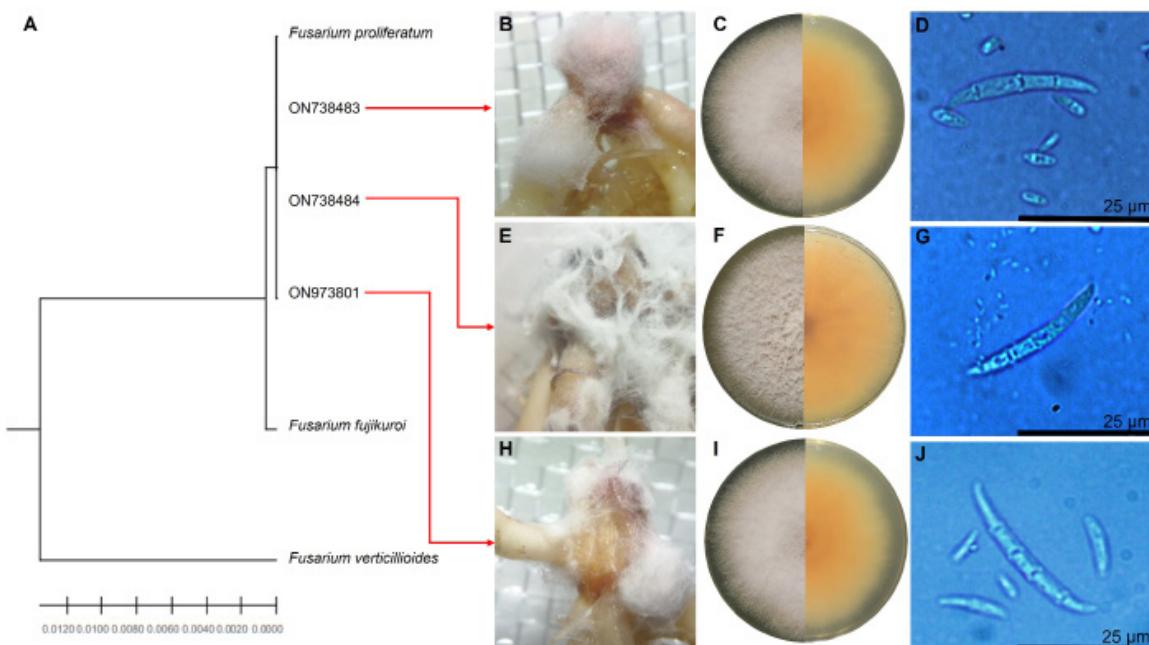


Figura 2. Aislados de *F. proliferatum* utilizados para las pruebas de patogenicidad por diferentes métodos de inoculación. A) Árbol filogenético concatenado de los aislados ON738483 (PISIR), ON738484 (P3DR) y ON973801 (P5DR) con los iniciadores ITS 4-ITS5, EF688-EF1521, TUB T1-BT2B. B) Colonización del rizoma por el aislado P1SIR, C) crecimiento micelial de *Fusarium* en anverso y reverso en medio PDA con 7 días de crecimiento, D) macro y microconidios a 40X. E) Colonización del rizoma por el aislado P3DR, F) crecimiento micelial de *Fusarium* en anverso y reverso en medio PDA con 7 días de crecimiento, G) macro y microconidios a 40X. H) Colonización del rizoma por el aislado P5DR, I) crecimiento micelial de *Fusarium* en anverso y reverso en medio PDA con 7 días de crecimiento, J) macro y microconidios a 40X.

Pruebas de patogenicidad. Con el método de inoculación mediante papel absorbente, se evidenció distribución del inóculo únicamente en la parte de contacto del rizoma con papel filtro (Figura 3 B). Resultado coincidente con lo reportado por

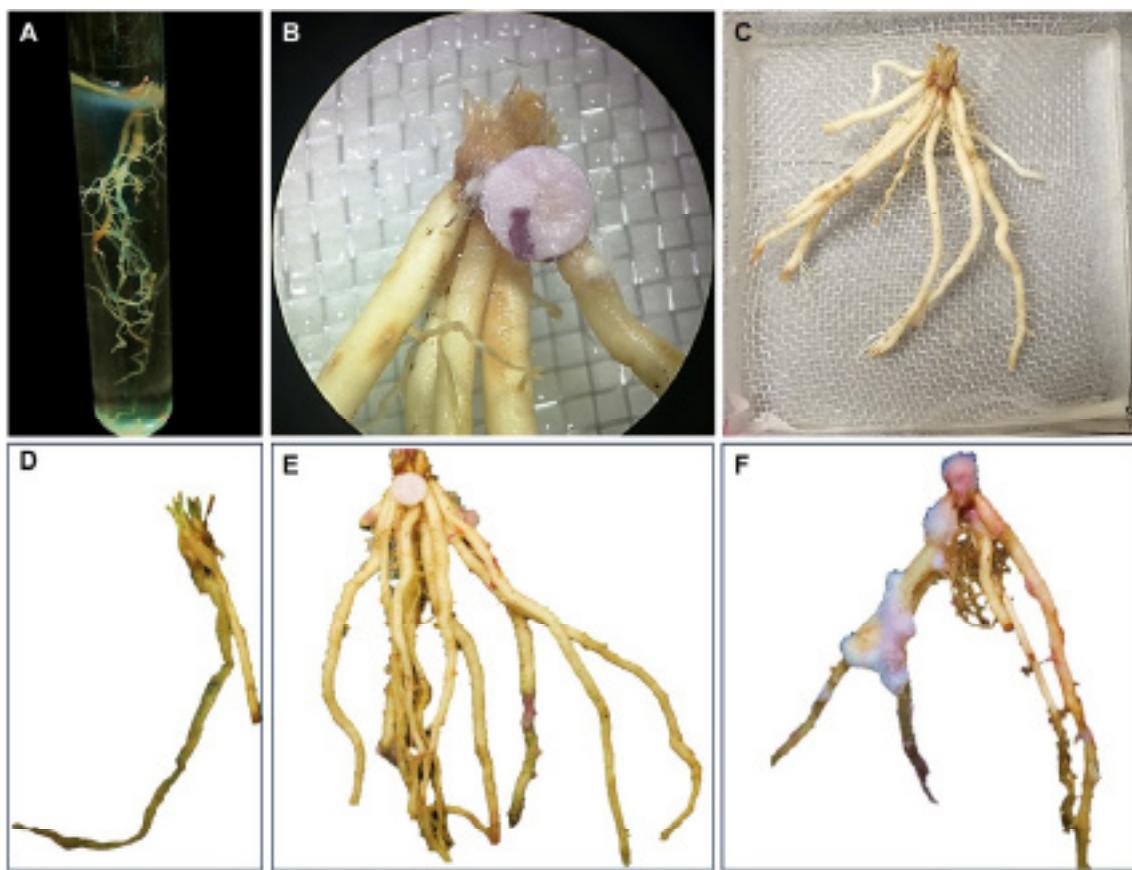


Figura 3. Métodos de inoculación con aislados de *Fusarium* en rizomas de esparrago. A) Inmersión de rizoma por 12 h; B) Inoculación con papel filtro; C) Inmersión de rizoma por 30 min, mostrando el rizoma suspendido por malla desinfestada y papel absorbente húmedo dentro de una caja cuadrada estéril; D) Rizoma por el método inmersión por 12 h E) Rizoma por el método inoculación con papel filtro F) Rizoma por el método de inmersión por 30 min.

Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata (2019) los cuales utilizaron discos de agar con crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en contacto con la raíz de *Solanum lycopersicum*. El método de inoculación por inmersión por 30 min mostró crecimiento micelial uniforme de tonalidades blancas concentrado en el rizoma, debido a que este tejido es un reservorio importante de fuentes de carbono con alto contenido de carbohidratos, esto explica la colonización de *F. proliferatum* concentrada en el rizoma, ya que, si bien es cierto que en la raíz hay contenido de nutrientes, en el rizoma por ser un sitio de organogénesis hay niveles más altos de carbohidratos y aminoácidos (Farahani-Kofoet *et al.*, 2020).

En el método de inmersión en tubos de ensayo por 12 h ocurrió la misma colonización centrada en el rizoma; sin embargo, presentó una actividad fermentativa derivada de la ausencia de oxígeno y por lo tanto una pérdida en la estructura de

pared celular del rizoma por efecto de hidrólisis (Corrales *et al.*, 2015), mostrando una maceración de la epidermis por este efecto. En este método, la maceración interfirió con la colonización de los aislados de *F. proliferatum* (Figura 3 D).

Determinación de severidad. La comparación de medias de los diferentes métodos de inoculación, mostraron que la presencia de necrosis y colonización del rizoma se expresó en el método de inoculación por 12 h (17.5%), seguido del método de inmersión por 30 min (16.1%), papel filtro (6.5%) y testigo (0.3%). Este último presentó oxidación natural del rizoma por ausencia del medio edáfico (Figura 4).

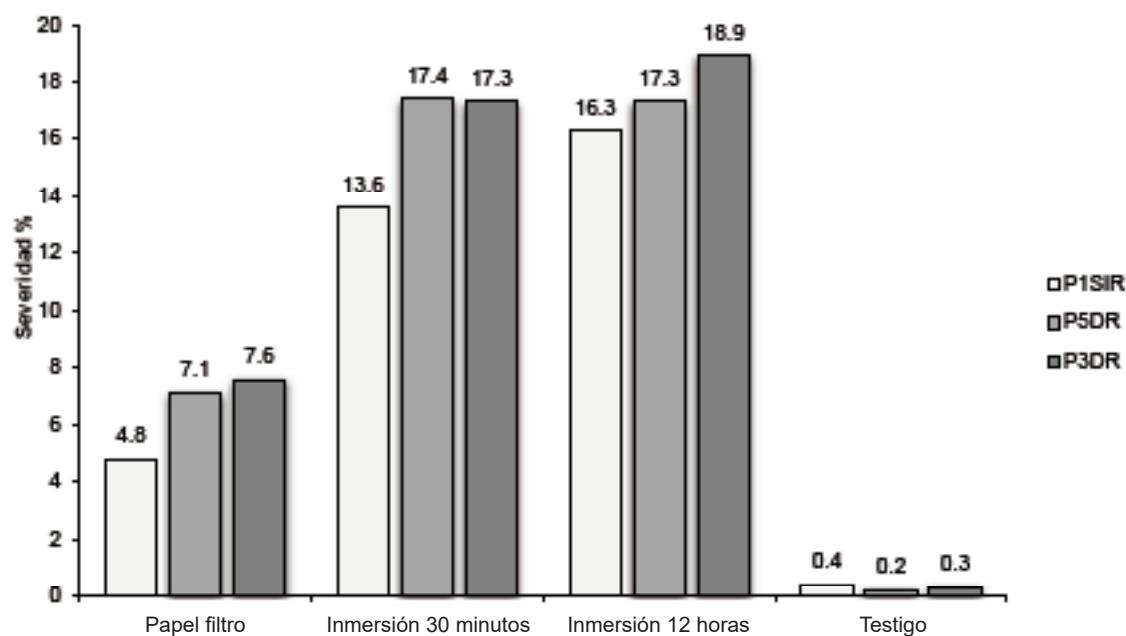


Figura 4. Porcentaje de severidad de tres aislados de *F. proliferatum* en espárrago bajo tres métodos de inoculación y un testigo sin inocular.

Los resultados indicaron que el aislado P3DR fue el más severo (7.6% en papel filtro y 18.9% por el método de inmersión por 12 h) en todos los métodos evaluados, superando en promedio por 3.0 y 0.7 % al aislado P5DR y P1SIR (Figura 4). Ángel-García *et al.* (2018), evaluaron diferentes métodos de inoculación de *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis*), donde obtuvieron un 100% de severidad de la secadera del maracuyá a los 6 días de la inoculación con el método de inmersión. En esta investigación, se obtuvo una severidad inferior al 19%; no obstante, se confirma el potencial de los aislados para inocular y causar síntomas, confirmando la patogenicidad de los tres aislados de *F.*

proliferatum colectados en parcelas productoras de espárrago en Atenco, Edo. de México. La colonización en los rizomas de espárrago en este experimento correspondió a lo reportado por Stephens y Elmer (1988) y Farahani-Kofoet *et al.* (2020).

De acuerdo con en el análisis de medias por el método de LSD de Fisher, se agruparon los tratamientos de inmersión (30 min y 12 h) en un bloque y el tratamiento por papel filtro y testigo en otro grupo. Por otro lado, entre los aislados de *F. proliferatum* se agruparon un grupo a P5DR y P1SIR, mientras que P3DR en otro grupo. Esto se confirma en la figura 4, donde se observa menor severidad de este último aislado en comparación con los aislados P5DR y P1SIR. La variación de severidad se ha reportado como factor de patogénesis, mencionando que este componente está estrechamente relacionado con la producción de enzimas degradadoras de la pared celular de la planta como factor de patogénesis para tener contacto con las fuentes de carbono del rizoma (Farahani-Kofoet *et al.*, 2020).

Se determinó que el aislado P3DR fue el más severo de acuerdo con la colonización y determinación de pixeles observados en los experimentos de métodos de inoculación. Aunque los métodos de inoculación empleados en este estudio indujeron colonización de *F. proliferatum* en los rizomas, el método de inmersión de rizomas por 30 min fue el más efectivo.

Los aislados colectados en esta investigación se registraron con los I.D. de accessiones ON738484 (P3DR), ON973801 (P5DR) y ON738483 (P1SIR) en el banco de genes del NCBI.

Aplicando criterios morfológicos, genómicos y patogénicos se identificó *Fusarium proliferatum* como el agente causal de la pudrición del rizoma del espárrago (*Asparagus officinalis*) en el genotipo Sulken en el municipio de Atenco, Edo. de México. Este es el primer reporte de este hongo en el Edo. de México. Esta información permitirá operar bajo el principio de prevención y establecer medidas de manejo en parcelas productoras de espárrago en la zona.

LITERATURA CITADA

- Abramoff MD, Magelhaes PJ and Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International 11: 36-42. <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/204900>
- Alves A, Crous PW, Correia A and Phillips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28: 1-13. <https://www.researchgate.net/publication/40095352>
- Ángel-García C, Robledo-Buriticá J y Castaño-Zapata J. 2018. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 21: 23-31. <https://dx.doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.659>
- Aoki TK, O'Donnell and Geiser DM. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology 80: 189-201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Booth C. 1988. *Fusarium*. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute. Slough, England. 156 p.

- Camacho-Aguiniga D, Hernández-Montiel LG, López-Aburto MG y Romero-Bastidas M. 2016. Identificación y caracterización del agente causal de la marchitez en espárrago en Baja California Sur. Revista Mexicana de Fitopatología 34 (Suplemento) https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Suplemento_34_2016
- Cardona-Piedrahita LF y Castaño-Zapata J. 2019. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lyco-persici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. Revista Academica Colombiana de Ciencias Naturales 43(167): 227–233. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Corrales LC, Antolinez RD, Bohórquez MM, y Corredor VAM. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova 13(24): 55-81. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200007&lng=en&tlng=es
- Elmer WH, Johnson DA and Mink GI. 1996. Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. Plant Disease 80: 117-125. <https://dx.doi.org/10.1094/PD-80-0117>
- FAO. 2019 Food and agriculture organization of the United Nations. http://www.fao.org/wIEWS-archive/germplasm_query.htm
- Farahani-Kofoet D, Witzel R, Graefe K, Grosch J and Zrenner R. 2020. Species-Specific impact of *Fusarium* infection on the root and shoot characteristics of Asparagus. Pathogens (Basel, Switzerland) 9(6): 509. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060509>
- Kelman A. 1967. Source book of laboratory exercises in plant pathology. APS. W. Freeman & Company. U.S.A. 387 p <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19681100010>
- Liu C, Xu W, Liu F and Jiang S. 2007. Fumonisins production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from asparagus crown. Mycopathologia 164(3): 127–134. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9017-8>
- Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peña B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutierrez-Espinosa MA, Rubio-Cortés R. 2021. *Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels. Mexican Journal of Phytopathology 39 (1). <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-8>
- Minas K, McEwan NR, Newbold CJ and Scott KP. 2011. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. FEMS Microbiology Letters 2: 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x>
- Moreno-Pinel R, Castro-López P, Die-Ramón VJ and Gil-Ligero J. 2021. Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable. Volume 9: Fruits and Young Shoots 450-455pp. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66961-4_12
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Quilambaqui JM, Zavaleta ME, Mora-Aguilera G, Delgadillo SF y Marín JA. 2004. Patogenicidad de Tres Especies de *Fusarium* Asociadas con el Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1): 30-36. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222105.pdf>
- Seefelder W, Gossmann M, and Humpf HU. 2002. Analysis of fumonisin B (1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(10): 2778–2781. <https://doi.org/10.1021/jf011503>
- SIAP. 2022. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap>
- Stephens CT and Elmer WH. 1988. An *in vitro* assay to evaluate sources of resistance in asparagus to *Fusarium* crown and root rot. Plant Disease 72: 334-337. <https://doi.org/10.1094/pd-72-0334>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Pp. 315-322. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. California, USA. 460 p. https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics